



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C08B 37/00, 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/12564</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01683</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月31日(31.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/244671 1998年8月31日(31.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本油脂株式会社(NOF CORPORATION)[JP/JP] 〒150-6019 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 砂本順三(SUNAMOTO, Junzo)[JP/JP] 〒525-0026 滋賀県草津市渋川1丁目1番30-1013号 Shiga, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 秋吉一成(AKIYOSHI, Kazunari)[JP/JP] 〒611-0042 京都府宇治市小倉町堀池25番地2 Kyoto, (JP)</p> <p>細谷竜三(HOSOTANI, Ryuzo)[JP/JP] 福井洋樹(FUKUI, Hiroki)[JP/JP] 〒305-0045 茨城県つくば市梅園2丁目24番地5 Ibaraki, (JP)</p> <p>林 昭男(HAYASHI, Akio)[JP/JP] 〒277-0831 千葉県柏市根戸421番地3 Chiba, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 柳原 成(YANAGIHARA, Shigeru) 〒105-0003 東京都港区西新橋3丁目15番8号 西新橋中央ビル503号 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, JP, KR, US, 欧州特許 (BE, CH, DE, FR, GB, IT, NL)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: HIGH-PURITY POLYSACCHARIDE CONTAINING HYDROPHOBIC GROUPS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 高純度疎水性基含有多糖類およびその製造方法</p> <p>(57) Abstract A process for producing a high-purity polysaccharide containing hydrophobic groups which comprises: a first-stage reaction in which a C₁₂₋₅₀ hydroxylic hydrocarbon or a sterol is reacted with a diisocyanate compound represented by the formula OCN-R¹-NCO (wherein R¹ is a C₁₋₅₀ hydrocarbon group) to produce a hydrophobic compound the molecule of which has an isocyanate group and a residue of one molecule of the reacted hydrocarbon or sterol; a second-stage reaction in which the hydrophobic isocyanate compound obtained in the first-stage reaction is reacted with a polysaccharide to produce a polysaccharide having, as hydrophobic groups, either C₁₂₋₅₀ hydrocarbon groups or seryl groups; and purifying the product of the second-stage reaction with a ketone solvent.</p>		

(57)要約

第1段階反応として、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ （式中、 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基である。）で表されるジイソシアナート化合物とを反応させて、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造し、

第2段階反応として、前記第1段階反応で得られたイソシアナート基含有疎水性化合物と多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造し、

次に第2段階反応の反応生成物をケトン系溶媒で精製することにより、高純度疎水性基含有多糖類を製造する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

高純度疎水性基含有多糖類およびその製造方法

5 技術分野

本発明は、高純度疎水性基含有多糖類およびその製造方法に関する。

背景技術

- 水溶性高分子には、天然高分子、半合成高分子、合成高分子がある。例えば、
- 1 0 天然高分子としては、デンプン、海藻などの炭水化物類；アラビアゴムなどの植物性粘質物；ニカワなどのタンパク質があげられる。半合成高分子としては、ビスコースなどのセルロース系高分子があげられる。合成高分子としては、ポリビニルアルコール、ポリビニルピリジン、ポリグリセリンなどがあげられる。これらの水溶性高分子の誘導体で、疎水性基を有する高分子の一部のものは、医薬物を含有する薬物運搬体を被覆する被覆材料などの医用材料として使用されている。
- 1 5 。例えば、リポソームマイクロカプセル、マイクロスフェア、O/Wエマルションおよび赤血球ゴースト等の薬物運搬体を疎水性基含有多糖類で被覆した多糖類被覆運搬体は、この運搬体に含まれている医薬品の自然流出が抑制されるほか、運搬体の細胞特異的移行率が向上することが知られている。
- 2 0 特に水溶性高分子が多糖類で、疎水性基がステリル基である化合物、すなわち多糖類-ステロール誘導体は、リポソームの多糖被覆剤（特開昭61-69801号）、脂肪乳剤の被覆剤（特開昭63-319046号）、多糖被覆エマルジョン作製時の高分子界面活性剤（特開平2-144140号）として既に開示されており、その合成方法の1つとして特開昭61-69801号の技術が開示されている。
- 2 5

近年、薬物運搬体としてリポソームおよびO/Wエマルションが有望とされて

いるが、これらの薬物運搬体を多糖類で被覆することにより、生体内外での化学的・物理的安定性を向上させるのみならず、さらに特定の細胞群に対する標的指向性も発揮されることが報告されている {Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 第791-796頁(1989)}。

- 5 この時に用いる多糖類-コレステロール誘導体の合成方法としては、特開昭61-69801号に示されるように、多糖類とモノクロ酢酸との反応によるカルボキシメチル化多糖類の合成(工程1)、

カルボキシメチル化多糖類とエチレンジアミンとの反応によるN-(2-アミノエチル)カルバモイルメチル化多糖類の合成(工程2)、

- 10 N-(2-アミノエチル)カルバモイルメチル化多糖類とコレステリルクロホルメイトとの反応によるN-[2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチル]カルバモイルメチル化多糖類の合成(工程3)

の3つの工程からなる方法がこれまで採用されてきた。

- 15 しかし特開昭61-69801号において開示されている方法では、工程2におけるカルボキシル基が未反応のまま最後まで残りやすく、多糖被覆した際のリポソームまたはエマルジョンの物理化学的安定性、細胞特異性、および適合性などにおいて、カルボキシ基の負荷電の影響を防止しえないという問題が残されている。また合成における工程数が長いという問題も残されている。

- 20 この問題を解決するために、特開平3-292301号には、1段階目にジイソシアナート化合物とステロールとを反応させて、アルカンの一端の α -位にステリル基を持ち、他端の ω -位にイソシアナート基を持つモノイソシアナート化合物を合成した後、2段階目にそのモノイソシアナート化合物と多糖類とを反応させることによって、多糖類にステリル基を簡便に導入できる合成法が開示されている。

- 25 しかし、この方法においては、1) 1段階目の反応において1分子のジイソシアナート化合物と2分子のステロールとが反応した副生物(以下、ステロール二

量体という場合がある)が、透析またはエタノールを用いた再沈殿による精製方法では完全に除去できず、このためステロール二量体が不純物として最終的に多糖類-ステロール誘導体に残存する、2) 2段階目の反応においてモノイソシアナート化合物と反応しなかった未置換の多糖類(未反応の多糖類という場合もある)が、不純物として最終的に多糖類-ステロール誘導体に混在するという問題がある。

多糖類-ステロール誘導体を、薬物の運搬体として用いる場合、あるいはリポソーム等に被覆して用いる場合には、より副生物の少ない高純度の多糖類-ステロール誘導体が望まれる。

10 前記の多糖類-ステロール誘導体、さらに多糖類以外の水溶性高分子とステロール以外の疎水性基が結合した両親媒性の複合体として、例えばポリエチレングリコールのアルキルジエステルについては、詳細な報告がされている {Dojin News No.85, 第3-11頁(1997年)}。

15 しかし、前述のように高純度の疎水性基含有水溶性高分子は、その製造方法の困難性からこれまで報告されていない。

本発明の第1の目的は、未置換の多糖類およびステロール二量体などの不純物の含有量が少ない高純度の疎水性基含有多糖類を容易に効率よく製造することができる高純度疎水性基含有多糖類の製造方法を提案することである。

20 本発明の第2の目的は、上記製造方法により得られる高純度疎水性基含有多糖類を提供することである。

発明の開示

25 本発明者らは、前記従来の問題点に鑑み鋭意検討した結果、精製工程において、再沈殿溶媒にケトン系溶媒を用いること、また超遠心分離による精製または非プロトン性極性溶媒による精製を組み合わせることにより、高純度疎水性基含有多糖類が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は

次の高純度疎水性基含有多糖類およびその製造方法である。

(1) 第1段階反応として、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ (式中、 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基である。) で表されるジイソシアナート化合物とを反応させて、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造し、

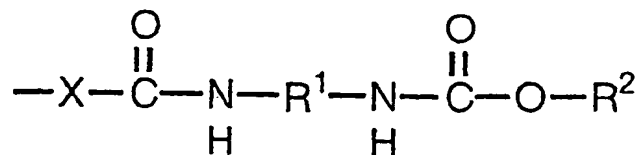
第2段階反応として、前記第1段階反応で得られたイソシアナート基含有疎水性化合物と多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造する方法において、

第2段階反応の反応生成物をケトン系溶媒で精製する高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(2) 多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンおよび水溶性セルロースからなる群より選択される1種以上である上記(1)記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(3) ケトン系溶媒がアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトンおよびジイソプロピルケトンからなる群より選択される1種以上である上記(1)または(2)記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(4) 疎水性基含有多糖類は、 $-\text{XH}$ 基〔式中、 X は酸素原子または NY で表される含窒素基(ここで、 Y は水素原子または炭素数1～10の炭化水素基である。)〕を有する多糖類において、その多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.1～10個の $-\text{XH}$ 基が、下記式(1)



5

(1)

〔式中、Xは前記Xと同じである。R¹は炭素数1～50の炭化水素基、R²は炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を示す。〕

で表される疎水性基で置換された疎水性基含有多糖類である

10 上記(1)ないし(3)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(5) 式(1)におけるR²がステリル基である上記(4)記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

15 (6) ケトン系溶媒で精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量が80重量%以上である上記(1)ないし(5)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(7) 未置換の多糖類の含有量が20重量%以下である上記(6)の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

20 (8) ジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が0.05重量%以下である上記(6)または(7)記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

25 (9) ケトン系溶媒で精製した精製物を超音波処理して水に微分散させ、次に超遠心分離によりさらに精製を行う上記(1)ないし(8)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(10) 超遠心分離により精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量

が 98 重量%以上である上記 (9) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(11) 未置換の多糖類の含有量が 2 重量%以下である上記 (10) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

5 (12) ジイソシアナート化合物中の 2 個の NCO 基が 2 個とも炭素数 12 ~ 50 の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が 0.05 重量%以下である上記 (10) または (11) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

10 (13) ケトン系溶媒で精製した精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した後、その溶液に水を加えて混合し、未置換の多糖類を水層に移行させ、次に層分離した水層を分離除去することによりさらに精製を行う上記 (1) ないし (8) のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

15 (14) ケトン系溶媒で精製した精製物に対して 3 ~ 50 重量倍の非プロトン性極性溶媒を添加して溶解した後、その溶液に対して 5 重量倍以上の水を添加して精製を行う上記 (13) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(15) 非プロトン性極性溶媒が N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミドおよびジメチルスルホキシドからなる群より選択される 1 種以上である上記 (13) または (14) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

20 (16) 非プロトン性極性溶媒を用いて精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量が 98 重量%以上である上記 (13) ないし (15) のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(17) 未置換の多糖類の含有量が 2 重量%以下である上記 (16) 記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

25 (18) ジイソシアナート化合物中の 2 個の NCO 基が 2 個とも炭素数 12 ~ 50 の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が 0.

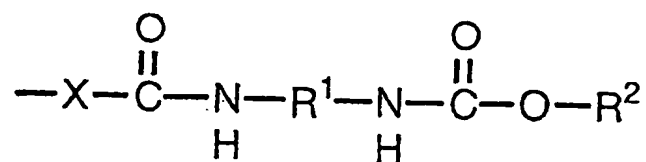
0.2重量%以下である上記(16)または(17)記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

(19) 第1段階反応として、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ (式中、 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基である。) で表されるジイソシアナート化合物とを反応させて、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造し、

第2段階反応として、前記第1段階反応で得られたイソシアナートと多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造し、

次に第2段階反応の反応生成物をケトン系溶媒で精製して得られる高純度疎水性基含有多糖類であって、

—XH基 [式中、Xは酸素原子またはNYで表される含窒素基 (ここで、Yは水素原子または炭素数1～10の炭化水素基である。)] を有する多糖類において、その多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.1～10個の—XH基が、下記式(1)



(1)

[式中、Xは前記Xと同じである。 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基、 R^2 は炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を示す。]

で表される疎水性基で置換された疎水性基含有多糖類を80重量%以上含有する高純度疎水性基含有多糖類。

(20) 多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンおよび水溶性セルロースからなる群より選択される1種以上である上記(19)記載の高純度疎水性基含有多糖類。

5

(21) 式(1)における R^2 がステリル基である上記(19)または(20)記載の高純度疎水性基含有多糖類。

(22) 未置換の多糖類の含有量が20重量%以下である上記(19)ないし(21)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

10

(23) ジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも炭素数12~50の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が0.05重量%以下である上記(19)ないし(22)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

15

(24) ケトン系溶媒で精製した精製物を超音波処理して水に微分散させ、次に超遠心分離によりさらに精製して得られるものである上記(19)ないし(23)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

20

(25) ケトン系溶媒で精製した精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した後、その溶液に水を加えて混合し、未置換の多糖類を水層に移行させ、次に層分離した水層を分離除去することによりさらに精製して得られるものである上記(19)ないし(23)のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1-2で得られたプルラン-コレステロール誘導体(CHP)の ^1H -NMRスペクトルを示した図である。

25

図2の(a)は実施例1-2で得られたプルラン-コレステロール誘導体(CHP)の超音波照射前のサンプルをSEC(サイズ排除クロマトグラフィー)で

分析した結果の図であり、(b)は超音波照射30分後のサンプルをSECで分析した結果の図である。図2の(c)は超遠心分離を行った後の上澄み溶液をSECにより分析した結果の図であり、(d)は超遠心分離を行った後の下層を再び水に膨潤させて超音波処理を行った溶液を、SECにより分析した結果の図である。縦軸は示差屈折計の強度(単位なし)である(以下、同様)。

図3は、実施例2-1で得られたマンナン-コレステロール誘導体(CHM)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した図である。

図4は、実施例2-2で得られたマンナン-コレステロール誘導体(CHM)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した図である。

10 図5は実施例1-2で得られたプルラン-コレステロール誘導体(CHP)を非極性溶媒で精製し、超音波照射した後サンプルをSEC(サイズ排除クロマトグラフィー)で分析した結果の図である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明において、「高純度」とは、炭化水素基やステリル基の疎水性基がジイソシアナート化合物と反応した二量体、および未置換の多糖類の含有量が少ないことを意味する。

本発明で用いる炭素数12~50の水酸基含有炭化水素は、疎水性基を導入する原料として用いるものである。本発明で用いる炭素数12~50の水酸基含有炭化水素基としては、例えばラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール、アラキニルアルコール、ドコサノール、ペンタコサノール、ヘキサコサノール、オクタコサノール等のアルコール由来の水酸基含有炭化水素基があげられる。これらの中では、入手が容易なことから、炭素数12~35、特に12~20のアルコールが好ましい。炭素数12~50

20 25 の水酸基含有炭化水素は1種単独で使用することもできるし、2種以上を組み合わせ使用することもできる。疎水性基を導入する原料として用いる水酸基含有炭

化水素の炭素数が12未満の場合、疎水性の凝集効果が十分発揮できにくくなり、好ましくない。一方、炭素数が50を越えると入手が困難になり、好ましくない。

本発明で用いるステロールは疎水性基を導入する原料として用いるものである。
5。本発明で用いるステロールとしては、例えばコレステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール等があげられる。これらの中では、入手性等からコレステロールが好ましい。ステロールは1種単独で使用することもできるし、2種以上を組み合わせることもできる。また炭素数12～50の水酸基含有炭化水素基とステロールとは併用してもよい。
10。

本発明で用いるジイソシアナート化合物は、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ （式中、 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基である。）で表されるジイソシアナート化合物である。 R^1 の炭素数が50を越えると入手が困難になり、好ましくない。ジイソシアナート化合物の具体的なものとしては、 R^1 がエチレン基であるエチレンジイソシアナート、ブチレン基であるブチレンジイソシアナート、ヘキサメチレン基であるヘキサメチレンジイソシアナート、ジフェニルメタン基であるジフェニルメタンジイソシアナートなどがあげられる。
15。

本発明で用いる多糖類としては、例えば天然または半合成の多糖類を用いることができる。具体的には、プルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンおよび水溶性セルロースからなる群から選択される1種以上があげられる。これらの中ではプルラン、マンナン、キシログルカン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース等が好ましい。またキチン、一部脱アセチル化したキチン、キトサン等の窒素原子を含有する多糖類も好ましい。多糖類は1種単独で用いることもできるし、2種以上を組み合わせることもできる。
20
25

本発明の製造方法により製造される疎水性基含有多糖類は、 $-XH$ 基〔式中、 X は酸素原子または NY で表される含窒素基（ここで、 Y は水素原子または炭素数 $1\sim 10$ の炭化水素基である。）〕を有する多糖類において、その多糖類を構成する糖単位 100 個あたり、 $0.1\sim 10$ 個、好ましくは $0.1\sim 6$ 個の $-XH$ 基が、前記式（１）で表される疎水性基で置換された疎水性基含有多糖類である。

前記式（１）において、 R^1 は前記ジイソシアナート化合物由来の基である。 R^2 は炭素数 $12\sim 50$ の水酸基含有炭化水素基および／またはステロール由来の基である。 R^2 で表される基の具体的なものとしては、ラウリル基、ミリスチル基、セチル基、ステアリル基、コレステリル基、スチグマステリル基、 β -シトステリル基、ラノステリル基、エルゴステリル基等があげられる。より好ましくは、ミリスチル基、ステアリル基、コレステリル基があげられる。

本発明の製造方法では、プルラン、マンナンのように多糖類を構成する単糖に CH_2OH 基が結合している多糖類を使用した場合、 CH_2OH 基の OH 基および単糖に直接結合している OH 基のどちらの基も前記式（１）で表される疎水性基で置換されるが、置換される割合は CH_2OH 基の OH 基の方が圧倒的に多く、単糖に直接結合している OH 基の割合は小さい。

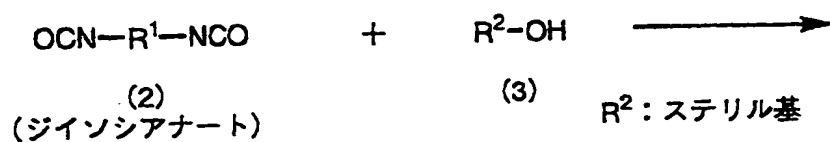
またキトサンのように CH_2OH 基および NH_2 基が結合している多糖類を使用した場合、 CH_2OH 基の OH 基、 NH_2 基および単糖に直接結合している OH 基のいずれの基も前記式（１）で表される疎水性基で置換されるが、置換される割合は CH_2OH 基の OH 基および NH_2 基が圧倒的に多く、単糖に直接結合している OH 基の割合は小さい。

本発明の製造方法は、下記の工程１～工程３または工程１～工程４の工程を含んでいる。以下の製造方法の説明では、多糖類としてプルラン、疎水性基としてステリル基を用いた場合について説明するが、他のものを用いた場合も同様にして製造することができる。なお本発明の製造方法に係る反応を下記反応式（Ⅰ）

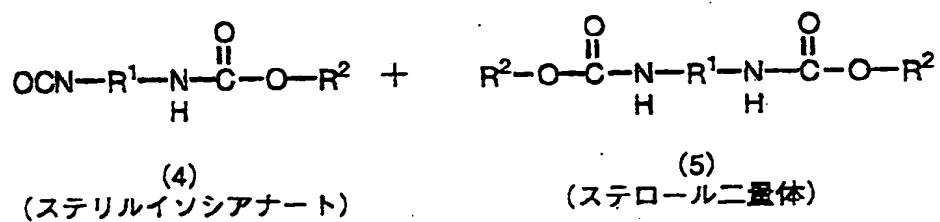
および反応式 (II) に示す。反応式 (I) が工程 1、反応式 (II) が工程 2 に対応している。

5

反応式 (I)

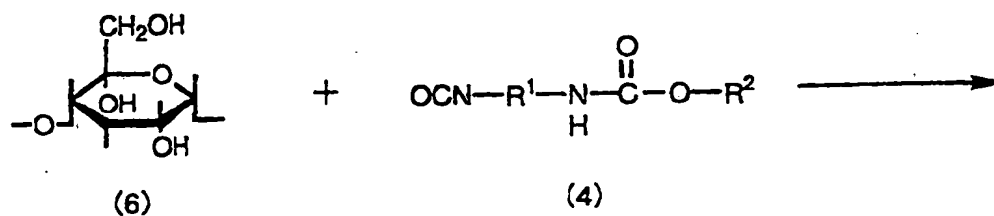


1 0

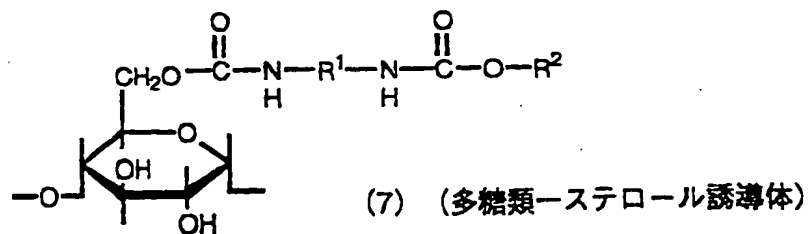


1 5

反応式 (II)



2 0



2 5

[工程 1]

反応式 (I) に示されているように、本発明に使用するアルカン類の一端にステリル基と他端にイソシアナート基を持つステリルイソシアナートは、式 (4) で表される化合物であり、式 (2) で表されるジイソシアナート化合物と、式 (3) で表されるステロールとの反応により得られる。式 (4) で表される化合物を製造するにあたり、有機溶媒中、塩基性触媒の存在下に、式 (2) で表されるジイソシアナート化合物の一端のイソシアナート基と、式 (3) で表されるステロールの水酸基とを反応させて、一端がウレタン結合でステロールと結合し、残りの一端がイソシアナート基のまま未反応で残存している、式 (4) で表されるステアリルイソシアナートを製造する。この反応では、式 (5) で表されるステロール二量体が副生成物として通常約 10 重量%生成する。

[工程 2]

反応式 (II) に示されているように、前記工程 1 で得られた式 (4) で表されるステアリルイソシアナートと、式 (6) で表される多糖類 (プルラン) とを反応させ、式 (7) で表される多糖類-ステロール誘導体 (疎水性基含有多糖類) を製造する。この反応は、有機溶媒中、塩基性触媒存在下に、式 (6) で表される多糖類の水酸基と式 (4) で表されるステリルイソシアナートとを付加反応させる。

[工程 3]

上記工程 2 で得られ反応生成物をケトン系溶媒にて再沈殿させて精製する (以下、この精製をケトン精製という)。このケトン精製により、工程 1 で副生成するステロール二量体が主として除去され、高純度の多糖類-ステロール誘導体 (疎水性基含有多糖類) を得ることができる。本発明においては、ケトン精製した精製物をケトン精製物と表記する。またケトン精製物はさらに反応溶媒を除去するために、透析法により精製することもできる。

[工程 4]

1) 前記の工程 3 で得られるケトン精製物 (透析した精製物も含む) を、超遠心分離によりさらに精製する。この超遠心分離による精製により、未置換の多糖類 (未反応の多糖類) が主として除去され、さらに高純度の疎水性基含有多糖類を得ることができる。

5 2) 本発明の製造方法では、上記 1) の超遠心分離による精製の代わりに、非プロトン性極性溶媒を用いて精製することもできる。非プロトン性極性溶媒を用いた精製は、前記の工程 3 で得られるケトン精製物 (透析した精製物も含む) に対して非プロトン性極性溶媒を加えて溶解させ、その溶液に対して水を加え、攪拌機等でよく混合し、層分離した水層を除去する。この非プロトン性極性溶媒による精製により、未置換の多糖類 (未反応の多糖類) が主として除去され、さら
10 に高純度の疎水性基含有多糖類を得ることができる。この操作は何度も繰り返して行ってもよく、2～3 回繰り返すことによって、疎水性基含有多糖類の純度はさらに向上する。さらに、非プロトン性極性溶媒除去を行って、疎水性基含有多糖類を粉末状の固体として得ることもできる。

15 以下、本発明における各工程をさらに詳細に説明する。

前記工程 1 において、式 (4) で表される化合物を製造する工程は、有機溶媒中、塩基性触媒の存在下で式 (2) で表されるジイソシアナート化合物と式 (3) で表されるステロールとを反応させることからなる。ここでジイソシアナート化合物の使用量は、ステロールに対して 1～30 モル当量、好ましくは 10～20
20 モル当量である。また塩基性触媒としてアミン類の添加が望ましく、その結果効率よく反応が進行する。

反応に使用する有機溶媒としては、エーテル系溶媒、非プロトン性極性溶媒、ハロゲン系溶媒、脂肪族および芳香族炭化水素系溶媒などがあげられる。エーテル系溶媒としては、例えばエチルエーテル等の脂肪族エーテル、テトラヒドロフ
25 ラン等の複素環式エーテルなどがあげられる。また非プロトン性極性溶媒としては、例えばアセトン、ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド

(DMSO)等があげられる。ハロゲン系溶媒としては、例えば塩化メチレン、クロロホルム等があげられる。脂肪族炭化水素溶媒としては、例えばペンタン、ヘキサン等があげられる。芳香族炭化水素溶媒としては、例えばベンゼン、トルエン等があげられる。これらの中では、芳香族炭化水素が好ましい。

- 5 反応式(I)の反応で用いるアミン類としては、トリエチルアミン、ピリジンなどがあげられる。アミン類の使用量はステロールに対して1~20モル当量、好ましくは1~3モル当量である。また反応時の温度および時間は用いるジイソシアナート化合物および溶媒などにより異なり、反応の進行状態により設定されるが、反応温度は好ましくは室温から100℃、反応時間は好ましくは3~24
- 10 時間である。

反応は乾燥した溶媒および塩基性触媒を用いることが好ましく、さらに不活性ガス雰囲気下で行うことが望ましい。不活性ガスとしては、例えば窒素、アルゴン等があげられる。

- 前記工程2において、式(7)で表される化合物を製造する工程は、有機溶媒
- 15 中、塩基性触媒の存在下で式(6)で表される多糖類と前記の工程1で製造した式(4)で表されるステリルイソシアナート化合物とを反応させることからなる。多糖類とステリルイソシアナート化合物の仕込み比は、多糖類に対するステリル基の導入量により設定されるが、多糖類の100単糖単位に対して0.1~10モル当量の範囲が望ましい。

- 20 反応に使用する有機溶媒としては、エーテル系溶媒、非プロトン性極性溶媒、ハロゲン系溶媒、脂肪族および芳香族炭化水素系溶媒などがあげられる。エーテル系溶媒としては、例えばエチルエーテル等の脂肪族エーテル、テトラヒドロフラン等の複素環式エーテルなどがあげられる。また非プロトン性極性溶媒としては、例えばアセトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド
- 25 (DMSO)等があげられる。ハロゲン系溶媒としては、例えば塩化メチレン、クロロホルム等があげられる。脂肪族炭化水素溶媒としては、例えばペンタン、

ヘキサン等があげられる。芳香族炭化水素溶媒としては、例えばベンゼン、トルエン等があげられる。これらの中では、非プロトン性極性溶媒が好ましい。

反応式 (II) の反応で用いる塩基性触媒としてはアミン類が好ましく、例えばトリエチルアミン、ピリジンなどがあげられる。アミン類の使用量は多糖類に対して1～10モル当量、好ましくは1～3モル当量である。反応時の温度および時間は用いる多糖類および溶媒などにより異なり、反応の進行状態により設定されるが、反応温度は好ましくは室温～100℃、反応時間は好ましくは30分～24時間である。

反応は乾燥した溶媒および塩基性触媒を用いることが好ましく、さらに不活性ガス雰囲気下で行うことが望ましい。不活性ガスとしては、例えば窒素、アルゴン等があげられる。

前記工程3のケトン精製に使用するケトン系溶媒としては、アセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトンおよびジイソプロピルケトン等からなる群より選択される1種以上があげられる。ケトン系溶媒の使用量は工程2で得られた反応溶液に対して4～50重量倍、好ましくは8～20重量倍である。前記工程2で得られ反応生成物をケトン系溶媒に添加すると、多糖類ーステロール誘導体（疎水性基含有多糖類）は沈殿し、工程1で副生成するステロール二量体はケトン系溶媒に溶解するので、沈殿物を分取することにより高純度の多糖類ーステロール誘導体を得ることができる。沈殿物は凍結乾燥法、真空乾燥法などの方法により乾燥することができる。ケトン精製は、透析法、エタノールを用いた再沈殿精製法、カラムクロマトグラフィー法などの従来の精製法に比べてステロール二量体の除去率が高く、このため高純度の疎水性基含有多糖類を容易に得ることができる。

ケトン精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量は80重量%以上、好ましくは90重量%以上である。また未置換の多糖類の含有量は20重量%以下、好ましくは10重量%以下である。さらにジイソシアナート化合物中の2個のNCO基

が2個とも疎水性基と反応した不純物の含有量は0.05重量%以下、好ましくは0.01重量%以下である。

前記工程4の1)の超遠心分離による精製法では、前記工程3のケトン精製物に水を加えて超音波照射した後、超遠心分離を行う。ここで用いる水としては、
5 蒸留水、イオン交換水等があげられる。水の使用量はケトン精製物に対して5～100重量倍、好ましくは30～60重量倍である。超遠心分離は、1万～20万G、好ましくは3万～10万Gで、1～24時間、好ましくは3～15時間行うのが望ましい。超遠心分離を行うと、分子量が大きい多糖類-ステロール誘導体が下層、分子量が小さい未置換の多糖類が上層に層分離するので、下層を分取
10 することにより、高純度の多糖類-ステロール誘導体を得ることができる。

超遠心分離した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量は98重量%以上、好ましくは99.9重量%以上である。また未置換の多糖類の含有量は2重量%以下、好ましくは0.1重量%以下である。さらにジイソシアナート化合物中の2
15 個のNCO基が2個とも疎水性基と反応した不純物の含有量は0.05重量%以下、好ましくは0.01重量%以下である。超遠心分離による精製を行うことにより、99.9重量%以上の高純度のものも容易に得ることができる。

前記工程4の2)の非プロトン性極性溶媒による精製において使用できる非プロトン性極性溶媒としては、例えばN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMAc)、1,3-ジメチル-2-イミダゾ
20 リジノン(DMI)およびジメチルスルホキシド(DMSO)等からなる群より選択される1種以上があげられる。非プロトン性極性溶媒の使用量は、前記工程3で得られたケトン精製物に対して3～50重量倍、好ましくは5～15重量倍である。3重量倍未満ではケトン精製物を溶解するには少なく、50倍超重量では後に水を加えたときに二層分離せずに混和してしまうので好ましくない。ケト
25 ン精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解させる温度は0～150℃、好ましくは室温～100℃である。なお、非プロトン性極性溶媒以外の溶媒は、疎水性基含

有多糖類および未置換の多糖類が溶解しないため、好ましくない。

前記工程4の2)において使用できる水としては、蒸留水、イオン交換水、純水等があげられる。水の使用量はケトン精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した溶液に対して5重量倍以上、好ましくは10～100重量倍である。5重量倍未満では二層分離せず、混和してしまうため好ましくない。一方100重量倍より多いと、未置換の多糖類の著しい除去効率の向上が望めないため好ましくない。水は所定量を一度に入れてから攪拌機等で混合するのがよく、攪拌しながら加えると混和して二層分離しにくいので好ましくない。また二層分離工程は、静置させても遠心機等で強制的に分離させてもよい。

10 ケトン精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した溶液に水を加えて混合し、水層と非プロトン性極性溶媒層とに二層分離させると、未置換の多糖類は水層に移行し、目的とする疎水性基含有多糖類は非プロトン性極性溶媒層に溶解したままの状態にあるので、水層を除去することにより、未置換の多糖類を除去することができる。水層を除去した非プロトン性極性溶媒溶液から非プロトン性極性溶媒を除去することにより、高純度の疎水性基含有多糖類を得ることができる。非プロトン性極性溶媒の除去には、クロマトグラフィー、凍結乾燥または再沈殿等の方法があげられる。特に再沈殿における貧溶媒としてはケトン系またはアルコール系溶媒が望ましく、例えばアセトン、メチルエチルケトン、メタノール、エタノール等があげられる。貧溶媒の使用量は、再沈殿させる溶液に対して4～50重量倍、好ましくは8～20重量倍である。沈殿物は凍結乾燥法、真空乾燥法などの方法により乾燥することができる。

20 非プロトン性極性溶媒による精製は、前記工程4の1)の超遠心分離による精製に比べ、より簡便にかつ効率よく処理することができる。これにより、医薬品等、生体に用いる場合に求められる高純度な疎水性基含有多糖類のより大量製造が可能となる。

非プロトン性極性溶媒で精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量は9

8重量%以上、好ましくは99.9重量%以上である。また未置換の多糖類の含有量は2重量%以下、好ましくは0.1重量%以下である。さらにジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも疎水性基と反応した不純物の含有量は0.02重量%以下、好ましくは0.01重量%以下である。非プロトン性極性
5 溶媒で精製することにより、99.9重量%以上の高純度のものも容易に得ることができる。

以上のような本発明の製造方法によれば、これまで目的生成物中に残存し、完全除去が極めて困難であった副生成物のステロール二量体、および未置換の多糖類を簡便に効率よく除去することができ、これにより高純度の高純度疎水性基含
10 有多糖類を得ることができる。

本発明の高純度疎水性基含有多糖類は、前記本発明の製造方法により得られる高純度疎水性基含有多糖類であって、前記式(1)で表される疎水性基を有し、純度が80重量%以上、好ましくは90重量%以上の高純度の疎水性基含有多糖類である。本発明の高純度疎水性基含有多糖類は、前記式(1)で表される疎
15 性基により凝集して微分散した溶液を形成することができ、その結果コアシェルの高分子ミセルの形成能がある。

本発明の高純度疎水性基含有多糖類は、医薬物を含有する薬物運搬体を被覆する被覆材料などの医用材料として使用することができる。例えば、リポソームマイクロカプセル、マイクロスフェア、O/Wエマルションまたは赤血球ゴースト等の薬物運搬体を被覆する被覆材料として使用することができる。この場合、
20 本発明の高純度疎水性基含有多糖類は副生物および未置換の多糖類の含有量が少なく高純度であるので、医用材料として安全に使用することができる。

以上の通り、本発明の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法は、ケトン系溶媒を用いて精製しているので、未置換の多糖類およびステロール二量体などの不純物の含有量が少ない高純度の疎水性基含有多糖類を容易に効率よく製造することが
25 できる。また超遠心分離による精製または非プロトン性極性溶媒による精製を

組み合わせて行うことにより、さらに高純度の疎水性基含有多糖類を製造することができる。

本発明の高純度疎水性基含有多糖類は、上記製造方法により得られるので、高純度であり、このため医用材料として安全に使用することができる。

5 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1-1

《N-(6-イソシアナートヘキシル) コレステルカルバメートの合成》

1 literのナス型フラスコに、コレステロール 25 g (0.065 mol)、トルエン 300 ml を加えて溶解し、さらにトリエチルアミン 17 ml (0.12 mol) を加えた。そこへ、トルエン 300 ml に溶解したヘキサメチレンジイソシアナート 161 g (0.96 mol, 14.8 eq.) を加え、窒素雰囲気下、80℃で約6時間反応させた。反応終了後、トルエンと過剰のヘキサメチレンジイソシアナートを減圧除去した。得られた黄色オイル状の残渣を室温で一夜放置することにより、淡黄色の結晶が生成した。結晶を取り出し、約 1 liter のヘキサンを加え、激しく振とうした後、上澄み液をデカンテーションにより除去した。この洗浄操作を計4回行った後、室温で3時間減圧乾燥することにより白色の固体(結晶)を得た。収量(収率) : 18.25 g (50.9%)

上記生成物の¹H-NMRとIRの測定結果を下記に示す。

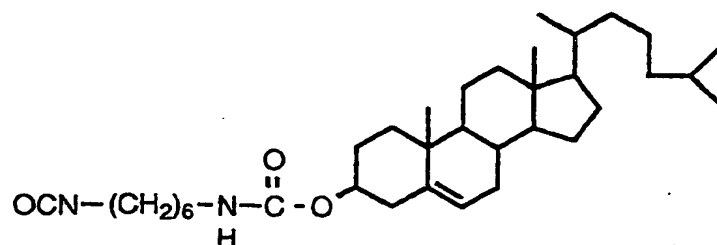
¹H-NMR ((δ) ppm, in CDCl₃, TMS) :

20 0.68-2.35 (m, 43H)、
 1.34-1.55 (m, 8H)、
 3.14-3.18 (m, 2H)、
 3.27-3.32 (t, J=6.6 Hz, 2H)、
 4.4 -4.6 (m, 2H)、
25 5.38 (m, 1H)。

IR (KBr, cm⁻¹) : 3260、2320、1680、1130

以上のデータから、得られた化合物が下記式(4a)で表されるN-(6-イソシアナートヘキシル) コレステリルカルバメートであることを確認した。

5



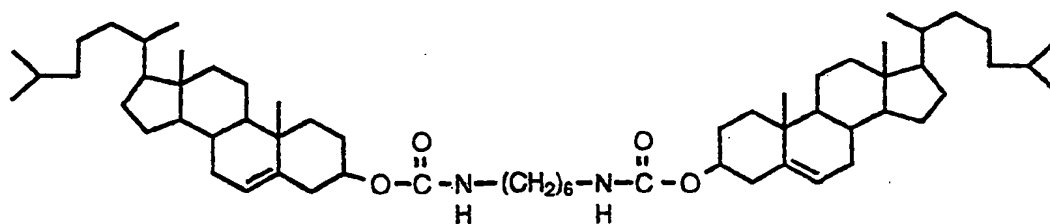
(4a)

10

また得られた白色結晶をプレパラティブTLC (Merck社製、Silica gel 60 F₂₅₄、展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル=2/1)を用いて展開した。その結果、副生成物である下記式(5a)で表されるコレステロール二量体(R_f値：0.65)の存在が確認された。TLC上のコレステロール二量体のバンドをアセトンで抽出して定量した結果、白色結晶中にコレステロール二量体が8重量%混在していることを確認した。

15

20



(5a)

25

実施例1-2

《プルラン-コレステロール誘導体 (CHP) の合成》

1 literのナス型フラスコに、プルラン（平均分子量：108000）40 g
（無水グルコースユニットとして248 mmol）とジメチルスルホキシド（DMSOと略記する場合がある）420 mlを加え、窒素雰囲気下80℃で攪拌して溶解させた。この溶液に、実施例1-1で合成したN-（6-イソシアナート
5 ヘキシル）コレステリルカルバメート1.78 g（3.21 mmol）をピリジン31.6 g（0.40 mol）に溶解した溶液を加え、90℃で3時間反応させた。

反応終了後、ジメチルスルホキシドを減圧除去し、得られたオイル状の残渣をアセトン6 literに滴下して沈殿を生成させ、精製した。上澄み液を除去後、得
10 られた沈殿にアセトン4 literを加え、室温で一晩放置した。沈殿を濾別採取した後、減圧乾燥した。得られた固体をジメチルスルホキシドに溶解し、これを透析膜（スペクトロポア社製 Spectra/Por 3, 分画分子量：3500）に充填し、蒸留水に対して一週間透析した。得られたポリマー溶液1.5 literを常法により凍結乾燥することによって、白色の固体（以下、アセトン精製物
15 という場合がある）を得た。収量31.7 g（収率76.2%）。

上記アセトン精製物の¹H-NMRとIRの測定結果を下記に示す。

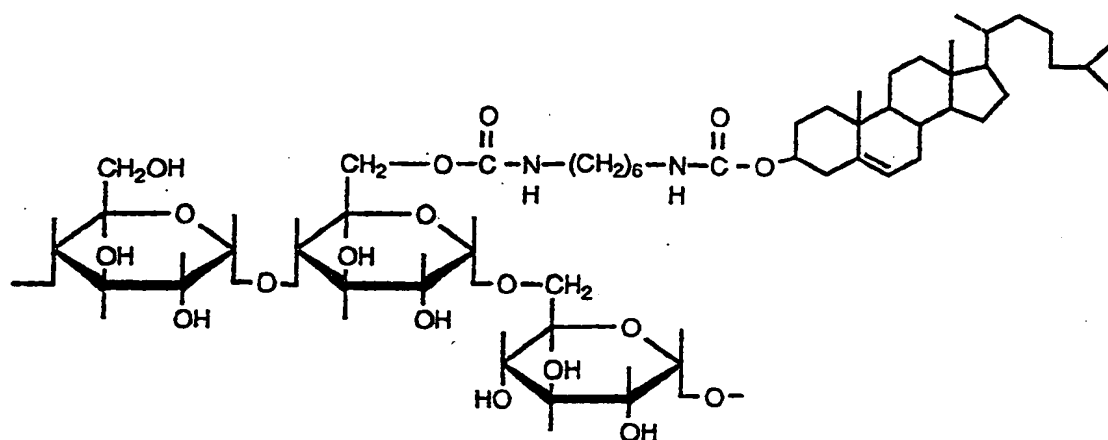
¹H-NMR（（δ）ppm、DMSO-d₆/D₂O=20/1, vol）：

0.68-2.40、
2.60-4.60、
20 4.70-5.30。

IR（KBr, cm⁻¹）：1680、1180-900。

以上のデータから、得られた化合物が下記式（7a）で表されるプルラン-コレステロール誘導体（以下、CHPと略記する場合がある）であることを確認した。

5



10

(7a)

上記アセントで精製した精製物をプレパラティブTLC (Merck社製、Silica gel 60 F₂₅₄、展開溶媒：ヘキサン／酢酸エチル＝2／1) を用いて分析した。その結果、前記式(5a)で表されるコレステロール二量体(R_f値：0.65)の存在は確認されなかった。またアセントで精製した精製物を¹H-NMR解析し、プロトン比によりコレステロール二量体の含有率を算出した。その結果、コレステロール二量体の存在は確認されなかった。従って、上記アセントで精製した精製物中の前記式(5a)で表されるコレステロール二量体の含有量は0重量%である。

また精製に使用したアセトン回収し、そこに含まれているコレステロール二量体を定量した。その結果、回収アセトン中に含まれているコレステロール二量体の含有量は0.140gであった。実施例1-2で原料として用いたN-(6-イソシアナートヘキシル)コレステリルカルバメート1.78g(3.21mmol)中に含まれているコレステロール二量体の量は0.142gである(実施例1-1において、コレステロール二量体の含有量が8重量%であることが確認されている。実施例1-1参照)と算出されるので、これらのデータからコレ

ステロール二量体の除去量を算出した。結果を表1に示す。

以上のようにして得られた、目的物である式(7a)で表されるプルランーコレステロール誘導体の¹H-NMRスペクトルを図1に示す。また¹H-NMRスペクトルの積分値から、プルランーコレステロール誘導体におけるプルランへの

5 コレステロール基の導入率を、次の数式(A)により算出した。

$$(100 + 2x) / 51x = b / a \quad \dots (A)$$

ここで用いた記号は次の通りである。

a : コレステロール基由来のピーク面積 ($\delta = 0.68 \sim 2.40$)

b : プルラン由来のピーク面積 ($\delta = 4.70 \sim 5.30$)

10 x : 単糖100個当たりのコレステロール基の置換度

上記計算の結果、前記式(7a)で表されるプルランーコレステロール誘導体におけるコレステロール基の置換度は単糖100個当たり1.1個であることが分かった。

比較例1

15 《エタノール再沈試験》

実施例1-2と同じ方法でプルランーコレステロール誘導体を合成した。反応終了後、エタノールに再沈殿させて精製し、プルランーコレステロール誘導体を得た。

上記エタノールで精製した精製物を実施例1-2と同様にプレパラティブTLCを用いて分析した。その結果、前記式(5a)で表されるコレステロール二量体(Rf値: 0.65)の存在が確認された。またエタノールで精製した精製物を実施例1-2と同様に¹H-NMR解析してコレステロール二量体の含有率を算出した。その結果、コレステロール二量体が0.4重量%の量で含まれていた。

20

25 また精製に使用したエタノールを回収し、そこに含まれているコレステロール二量体を定量した結果、0.016gであった。このデータから実施例1-2と

同様にしてコレステロール二量体の除去量を算出した。結果を表1に示す。

表1

5			実施例1-2	比較例1
	使用した再沈殿溶媒		アセトン	エタノール
	10	コレステロール二量体 含有率(重量%)	0	0.4
		コレステロール二量体 除去率(重量%)	98.6	11.3

表1から、再沈殿溶媒にアセトンを用いて精製することにより、コレステロール二量体をほぼ完全に除去できることが確認された。

実施例1-3

《プルラン-コレステロール誘導体(CHP)の精製》

実施例1-2で合成したプルラン-コレステロール誘導体(CHP)40mgに純水20mlを加え、プローブ型のソニケーター(Tomy URP社製、プローブ外径=5mm)を用い、40Wで30分間、超音波照射した。この時容器の外側を氷水で冷却し、常に溶液の温度を4℃以下に保った。

次に、超音波照射後のサンプルを10mlずつ遠心管にとり、55000Gで、25℃で10時間、超遠心分離を行った。これにより相分離が生じ、未置換のプルラン(未反応のプルラン)が上澄み液、プルラン-コレステロール誘導体(CHP)が下層に分離された。

超音波照射前と後のサンプルをSEC(サイズ排除クロマトグラフィー)で分

析した。SECの条件は次の通りである。結果を図2の(a)、(b)にそれぞれ示す。

使用機器：TOSOH HPSECシステム（東ソー（株）製、商標）

カラム：TSK-gel G4000SWXL（東ソー（株）製、商標）

5 溶離液：0.02%-NaN₃イオン交換水

流量：0.5ml/min

温度：35℃

検出器：RI（示差屈折計）

図2の(b)のピーク面積から計算して、低分子量のプルラン（未置換のプルラン）がアセトン精製物中に約5重量%含まれていることが分かった。また超遠心分離を行った後の上澄み溶液をSECにより解析した。結果を図2の(c)に示す。また下層のゲル（沈殿物）を再び水に膨潤させ、上記と同じ超音波処理を行った溶液をSECにより解析した。結果を図2の(d)に示す。これらの結果から、上澄みに不純物質である低分子量のプルラン（未置換のプルラン）がほぼ
10 100重量%除かれていること、また沈降物中には低分子量のプルランが含まれていないことが確認された。

以上の結果から、前記式(7a)で示されるプルラン-コレステロール誘導体(CHP)が高純度で得られることが確認された。結果を表2にまとめる。

表2

20

アセトン精製物のCHPの含有量（重量%）	95
超遠心分離精製物のCHPの含有量（重量%）	100
未置換のプルランの含有量（重量%）	0
コレステロール二量体の含有量（重量%）	0

25

実施例2-1

《マンナンーコレステロール誘導体 (CHM) の合成1》

実施例1-2と同じ反応操作により、マンナン (シグマ社製、市販品) と、N- (6-イソシアナートヘキシル) コレステリルカルバメートを反応させた。各原料の仕込み量を以下に示した。

5 1) マンナン (Mw : 85000) : 26.2 g (無水マンノースユニットとして162 mmol)

2) N- (6-イソシアナートヘキシル) コレステリルカルバメート : 1.08 g (1.95 mmol)

3) ピリジン : 19.2 g (243 mmol)

10 4) ジメチルスルホキシド : 320 ml

反応終了後、アセトン溶媒で再沈殿して精製を行った。次に透析を行った後、凍結乾燥することにより白色の固体を21.5 g (収率79.5%) 得た。

上記アセトン精製物の¹H-NMRとIRの測定結果を下記に示す。

¹H-NMR ((δ) ppm, DMSO-d₆/D₂O=20/1, vol) :

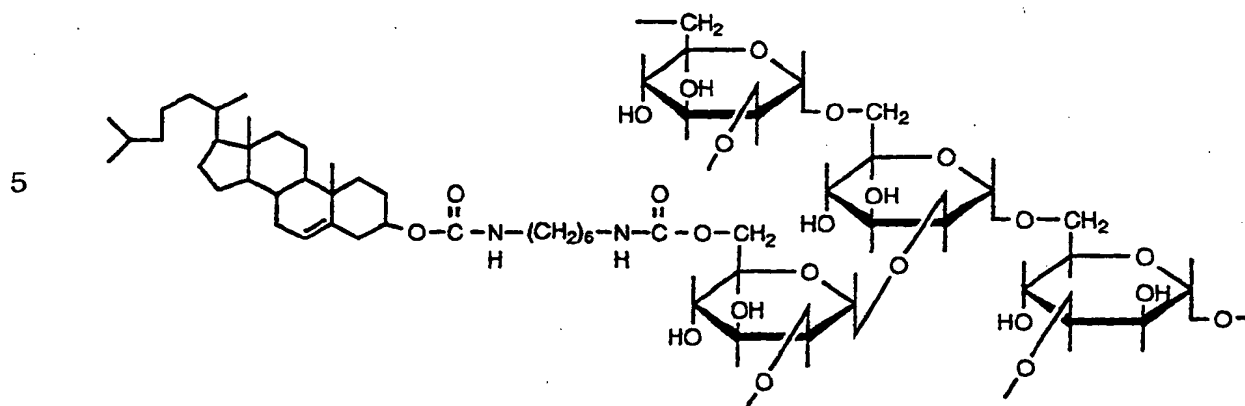
15 0.68-2.40、

2.60-4.60、

4.60-5.40。

IR (KBr, cm⁻¹) : 1680、1180-900

20 以上のデータから、得られた化合物が下記式 (7b) で表されるマンナンーコレステロール誘導体 (CHM) であることを確認した。



(7b)

10

上記アセントで精製した精製物を実施例1-2と同様にプレパラティブTLCを用いて分析した。その結果、前記式(5a)で表されるコレステロール二量体(Rf値: 0.65)の存在は確認されなかった。またアセントで精製した精製物を 1H -NMR解析し、プロトン比によりコレステロール二量体の含有率を算出した。その結果、コレステロール二量体の存在は確認されなかった。従って、上記アセントで精製した精製物中の前記式(5a)で表されるコレステロール二量体の含有量は0重量%である。

15

以上のようにして得られた前記式(7b)で表される化合物の 1H -NMRスペクトルを図3に示す。この化合物におけるマンナンへのコレステロール基の導入率を実施例1-2と同様に算出した。その結果、コレステロール基の置換度は単糖100個当たり1.1個であることが分かった。

20

次に、上記で得られたアセトン精製物を実施例1-3と同様に超遠心分離により精製し、低分子量のマンナン(未置換のマンナン)を分離した。結果を表3に示す。

25

表 3

5	アセトン精製物のCHMの含有量(重量%)	90
	超遠心分離精製物のCHMの含有量(重量%)	100
	未置換のプルランの含有量(重量%)	0
	コレステロール二量体の含有量(重量%)	0

実施例 2-2

《マンナン-コレステロール誘導体(CHM)の合成2》

10 実施例 1-2 と同じ反応操作により、マンナン(シグマ社製、市販品)と、N-(6-イソシアナートヘキシル) コレステリルカルバメートを反応させた。各原料の仕込み量を以下に示した。

1) マンナン(Mw: 85000): 5 g (無水マンノースユニットとして 31 mmol)

15 2) N-(6-イソシアナートヘキシル) コレステリルカルバメート: 138 mg (0.25 mmol)

3) ピリジン: 3.7 g (47 mmol)

4) ジメチルスルホキシド: 75 ml

20 反応終了後、アセトン溶媒で再沈殿して精製を行った。次に透析を行った後、凍結乾燥することにより白色の固体を 4.05 g (収率 78.8%) 得た。

上記アセトン精製物の¹H-NMRとIRの測定結果を下記に示す。

¹H-NMR ((δ) ppm, DMSO-d₆/D₂O = 20/1, vol):

0.68-2.40、

2.60-4.60、

25 4.60-5.40。

IR (KBr, cm⁻¹): 1680、1180-900

以上のデータから、得られた化合物が前記式（7b）で表されるマンナンーコレステロール誘導体（CHM）であることを確認した。

上記アセントで精製した精製物を実施例1-2と同様にプレパラティブTLCを用いて分析した。その結果、前記式（5a）で表されるコレステロール二量体（Rf値：0.65）の存在は確認されなかった。またアセントで精製した精製物を¹H-NMR解析し、プロトン比によりコレステロール二量体の含有率を算出した。その結果、コレステロール二量体の存在は確認されなかった。従って、上記アセントで精製した精製物中の前記式（5a）で表されるコレステロール二量体の含有量は0重量%である。

10 以上のようにして得られたマンナンーコレステロール誘導体（CHM）の¹H-NMRスペクトルを図4に示す。この化合物におけるマンナンへのコレステロール基の導入率を実施例1-2と同様に算出した。その結果、コレステロール基の置換度は単糖100個当たり0.8個であることが分かった。

次に、上記で得られたアセトン精製物を実施例1-3と同様に超遠心分離により精製し、低分子量のマンナン（未置換のマンナン）を分離した。結果を表4に示す。

表4

20	アセトン精製物のCHMの含有量（重量%）	87
	超遠心分離精製物のCHMの含有量（重量%）	100
	未置換のプルランの含有量（重量%）	0
	コレステロール二量体の含有量（重量%）	0

実施例3～6

25 《高純度ステリル基含有多糖類の製造》

天然由来の多糖であるキシログルカン（実施例3）、アミロース（実施例4）

、デキストラン（実施例5）および合成多糖類であるヒドロキシエチルセルロース（実施例6）を用い、実施例1-2および実施例1-3と同様の反応操作により高純度多糖類-コレステロール誘導体を得た。

各種解析により、コレステリル基の導入量、アセトン精製によるコレステロール二量体の除去率（重量％）と含有率（重量％）を求めた。また未置換の多糖類の含有率を遠心精製前後でそれぞれ求めた。結果を表5にまとめて示す。

10

15

20

25

表5から、プルラン、マンナンと同様に他の多糖類体でもコレステリル基を導入でき、かつコレステロール二量体および未置換の多糖類が除去できることが分かった。

実施例7-1

5 《N-(6-イソシアナートヘキシル)ステアリルカルバメートの合成(ステアリルプルランの合成)》

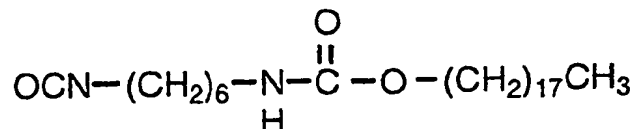
1 literのナス型フラスコに、ステアリルアルコール3.48 g (12.9 mmol)、トルエン50 mlを加えて溶解し、さらにピリジン2.04 g (25.8 mmol)を加えた。そこへ、トルエン50 mlに溶解したヘキサメチレンジイソシアナート30 g (178 mmol, 14.8 eq.)を加え、窒素雰囲気下、80℃で約3時間反応させた。反応終了後、トルエンおよび過剰のヘキサメチレンジイソシアナートを減圧除去することにより、淡黄色の結晶が生成した。結晶を取り出し、約1 literのヘキサンを加え、激しく振とうした後、上澄み液をデカンテーションにより除去した。この洗浄操作を計4回行った後、室温で
10
15 3時間減圧乾燥することにより白色の固体(結晶)を2.75 g得た(収率48.7%)。

上記生成物の¹H-NMRの測定結果を下記に示す。

¹H-NMR ((δ) ppm, CDCl₃, TMS) :

0.88 (t, d = 6.8 Hz, 3H)、
20 1.10-1.65 (m, 40H)、
3.14-3.18 (m, 2H)、
3.29 (t, J = 6.6 Hz, 2H)、
4.01-4.06 (m, 2H)、4.61 (m, 1H)。

以上のデータから、得られた化合物が下記式(8)で表されるN-(6-イソ
25 シアナートヘキシル)ステアリルカルバメートであることを確認した。

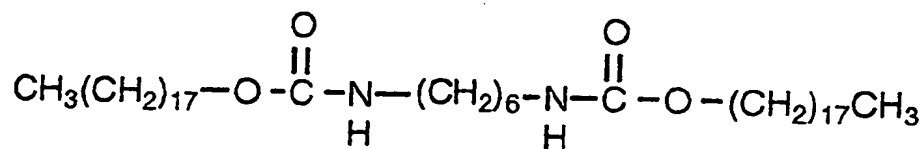


5

(8)

また得られた白色結晶を実施例1-1と同様にプレパラティブTLCに展開した。その結果、副生成物である下記式(9)で表されるステアリル二量体(Rf値: 0.68)の存在が確認された。TLC上のステアリル二量体のバンドをアセトンで抽出して定量した結果、白色結晶中にステアリル二量体が3重量%混在していることが確認された。

10



15

(9)

実施例7-2

《ステアリル-プルラン誘導体(STP)の合成》

20 100mlのナス型フラスコに、プルラン(Mw: 108000) 2.0g (無水グルコースユニットとして12.3mmol)とジメチルスルホキシド30mlを加え、窒素雰囲気下80℃で攪拌して溶解させた。この溶液に、実施例7-1で合成したN-(6-イソシアナートヘキシル)ステアリルカルバメート70mg(0.148mmol)をピリジン1.47g(14.6mmol, 1.2eq.)に溶解した溶液を加え、90℃で2時間反応させた。

25

反応終了後、ジメチルスルホキシドを減圧除去し、得られたオイル状の残渣を

アセトン300mlに滴下して沈殿を生成させ、精製した。上澄み液を除去後、
得られた沈殿にアセトン200mlを加え、室温で一晩放置した。沈殿を濾別採
取した後、減圧乾燥した。得られた固体をジメチルスルホキシドに溶解し、これ
を透析膜（Spectra社、Spectra/Por3，分画分子量：350
5 0）に充填し、蒸留水に対して一週間透析した。得られたポリマー溶液150m
lを凍結乾燥することにより、白色の固体（以下、アセトン精製物という場合が
ある）を1.60g得た（収率79.2%）。

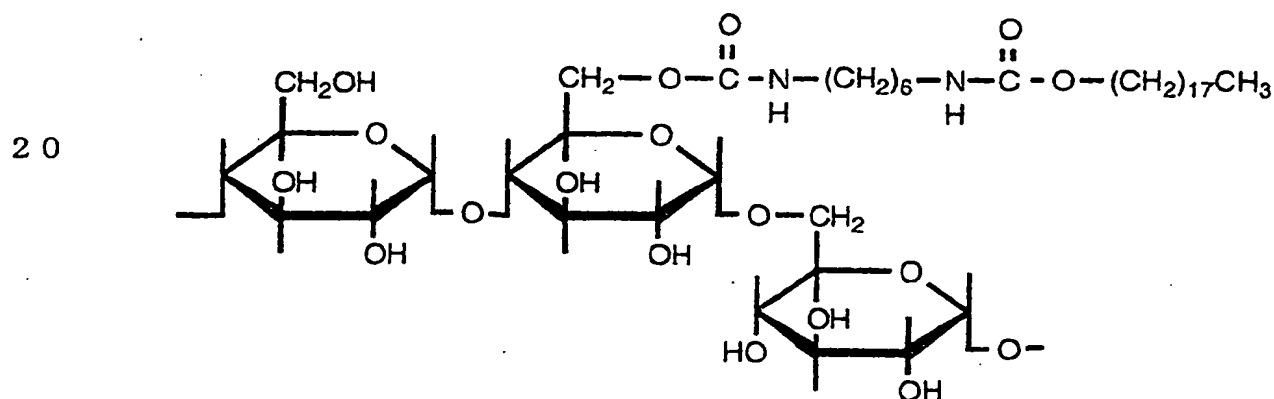
上記アセトン精製物の $^1\text{H-NMR}$ とIRの測定結果を下記に示す。

$^1\text{H-NMR}$ ((δ) ppm, $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}=20/1$, vol) :

10 0.86-1.70、
2.60-4.60、
4.60-5.30。

IR (KBr, cm^{-1}) : 1680, 1180-900

15 以上のデータから、得られた化合物が下記式(10)で表されるステアリル
プルラン誘導体(STP)であることを確認した。



25

上記アセントで精製した精製物を実施例 1-2 と同様にプレパラティブ TLC を用いて分析した。その結果、前記式 (9) で表されるステアリル二量体の存在は確認されなかった。またアセントで精製した精製物を ^1H -NMR 解析し、プロトン比によりステアリル二量体の含有率を算出した。その結果、ステアリル二

5 量体の存在は確認されなかった。従って、上記アセントで精製した精製物中の前記式 (9) で表されるステアリル二量体の含有量は 0 重量%である。

また ^1H -NMR スペクトルの積分値から、ステアリル基のプルランへの導入率を下記数式 (B) により算出した。

$$(100 + 2x) / 43x = b / a \quad \dots (B)$$

10 ここで、用いた記号は次の通りである。

a : ステアリル基由来のピーク面積 ($\delta = 0.86 \sim 1.70$)

b : プルラン由来のピーク面積 ($\delta = 4.60 \sim 5.30$)

x : 単糖 100 個当たりのステアリル基の置換度

上記計算の結果、ステアリル-プルラン誘導体におけるステアリル基の置換度は単糖 100 個当たり 0.8 個であることが分かった。

15

次に、上記で得られたアセトン精製物を実施例 1-3 と同様に超遠心分離により精製し、低分子量のプルラン (未置換のプルラン) を分離した。結果を表 6 に示す。

表 6

20

アセトン精製物の STP の含有量 (重量%)	92
超遠心分離精製物の STP の含有量 (重量%)	100
未置換のプルランの含有量 (重量%)	0
ステアリル二量体の含有量 (重量%)	0

25

実施例 8-1

《非プロトン極性溶媒による精製》

実施例 1-2 によって得たプルラン-コレステロール誘導体 10 g を、非極性溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO) 70 g に溶解した後、この溶液へ
5 水 1400 g を加えてマグネチックスターラーで 10 分間攪拌した。攪拌終了後、そのまま室温で 1 時間静置した。上澄み層をデカンテーションにより除去し、取り出した量と同量の水を加えてマグネチックスターラーで 10 分間攪拌し、その後 1 時間静置した。この操作を計 2 回行い、精製した。次に、下層に水 1000 g を加えた後、2 日間凍結乾燥した。その結果、白色固体を 7.5 g 得た (収
10 率 75%)。結果を表 7 および表 8 にまとめる。

得られた白色固体に水を加えて 0.2 重量% 溶液とし、プローブ型のソニケーター (Tomy URP、プローブ外径 5 mm、40 W) で 15 分間超音波照射した。超音波照射後のサンプルを下記条件でサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析した。結果を図 5 に示した。図 5 ではプルランのピークは見られず、
15 未置換のプルランが除去された高純度プルラン-コレステロール誘導体を得られたことがわかる。

● SEC の分析条件

使用機器 : TOSO H HPSEC システム (東ソー (株) 製、商標)
カラム : TSK-gel G4000SWXL (東ソー (株) 製、商標)
20 溶離液 : 0.02% - NaN₃ イオン交換水
流量 : 0.5 ml/min
温度 : 35°C
検出器 : RI (示差屈折計)

実施例 8-2 ~ 8-6

25 表 7 および表 8 に示す疎水性基含有多糖類および非プロトン性極性溶媒を使用し、また表 7 および表 8 に示す精製条件で、実施例 8-1 と同様の操作で精製操

作を行った。すべて二層分離操作を2回繰り返して精製を行った。結果を表7および表8にまとめる。

得られた各疎水性基含有多糖類をSEC分析した結果、どの実施例のものも未置換の多糖類のピークは見られず、ほぼ100重量%の疎水性基含有多糖類に精

5 製されたことが確認された。

10

15

20

25

表7 アセトン精製物結果

	実施例 8-1	実施例 8-2	実施例 8-3	実施例 8-4	実施例 8-5	実施例 8-6
原料多糖類の種類	プルラン	プルラン	プルラン	プルラン	マンナン	プルラン
疎水性基の種類	コレステロール基	コレステロール基	コレステロール基	コレステロール基	コレステロール基	スレアリル基
疎水性基導入量 *1	1.1	1.3	2.9	1.1	1.9	0.8
合成物の略号	CHP	CHP	CHP	CHP	CHM	STP
未反応多糖類含有量 (重量%)	5	10	16	5	20	16
二量体含有量 (重量%)	0	0	0	0	0	0
純度 (重量%)	95	90	84	95	80	84

*1 単糖100個当たりの導入基の数

表8 非プロトン性極性溶媒による精製および結果

	実施例 8-1	実施例 8-2	実施例 8-3	実施例 8-4	実施例 8-5	実施例 8-6
アセトン精製物の使用量 (g)	10	40	5	10	2	3
非プロトン性極性溶媒 種類 *1 使用量 (g) 使用倍率	DMSO 70 7	DMSO 320 8	DMSO 50 10	DMF 70 7	DMSO 12 6	DMAc 18 6
水の使用量 (g)	1400	5000	800	1000	150	300
処理方法	水洗 二層分離 工程数: 2	水洗 二層分離 工程数: 2	水洗 二層分離 工程数: 2	水洗 二層分離 工程数: 2	水洗 二層分離 工程数: 2	水洗 二層分離 工程数: 2
処理時間 (時間)	5	5	4	5	4	4
収率 (重量%)	75	75	80	72	65	69
純度 (重量%)	100	100	100	100	100	100
未反応多糖類含有量 (重量%)	0	0	0	0	0	0

*1 DMSO: ジメチルスルホキシド

DMF: N, N-ジメチルホルムアミド

DMAc: N, N-ジメチルホルムアミド

非プロトン性極性溶媒を用いた精製方法においては、約5時間で10gを精製
することができ、収率も65重量%以上で良好であった。また1回当たりの精製
工程は約2時間であった。また精製量に関しても原理的に制限がなく、容易に大
量精製が可能である。以上の点から、非プロトン性極性溶媒を用いた精製方法は
5 工業的な大量製造に非常に有効であることが分かる。

産業上の利用可能性

本発明の製造方法により得られる高純度疎水性基含有多糖類は、医薬物を含有
する薬物運搬体を被覆する被覆材料などの医用材料として使用することができる
1 0 。例えば、リポソームマイクロカプセル、マイクロスフェア、O/Wエマルシ
ョンまたは赤血球ゴースト等の薬物運搬体を被覆する被覆材料として使用するこ
とができる。この場合、本発明の高純度疎水性基含有多糖類は副生物および未置
換の多糖類の含有量が少なく高純度であるので、医用材料として安全に使用する
ことができる。

1 5

2 0

2 5

請求の範囲

1. 第1段階反応として、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ （式中、 R^1 は炭素数1～50の炭化水素基である。）で表されるジイソシアナート化合物とを反応させて、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造し、

第2段階反応として、前記第1段階反応で得られたイソシアナート基含有疎水性化合物と多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造する方法において、

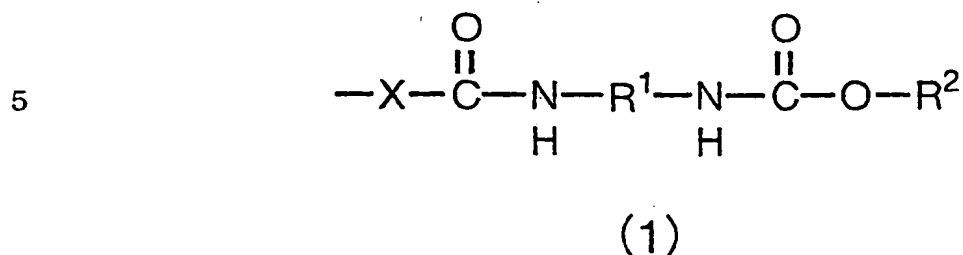
第2段階反応の反応生成物をケトン系溶媒で精製する高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

2. 多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンおよび水溶性セルロースからなる群より選択される1種以上である請求の範囲第1項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

3. ケトン系溶媒がアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトンおよびジイソプロピルケトンからなる群より選択される1種以上である請求の範囲第1項または第2項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

4. 疎水性基含有多糖類は、 $-\text{XH}$ 基〔式中、 X は酸素原子または NY で表される含窒素基（ここで、 Y は水素原子または炭素数1～10の炭化水素基であ

る。)〕を有する多糖類において、その多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.1～10個の-XH基が、下記式(1)



〔式中、Xは前記Xと同じである。R¹は炭素数1～50の炭化水素基、R²は炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を示す。〕

で表される疎水性基で置換された疎水性基含有多糖類である

請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

15 5. 式(1)におけるR²がステリル基である請求の範囲第4項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

6. ケトン系溶媒で精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量が80重量%以上である請求の範囲第1項ないし第5項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

20

7. 未置換の多糖類の含有量が20重量%以下である請求の範囲第6項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

25 8. ジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が0.05

重量%以下である請求の範囲第6項または第7項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

9. ケトン系溶媒で精製した精製物を超音波処理して水に微分散させ、次に
5 超遠心分離によりさらに精製を行う請求の範囲第1項ないし第8項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

10. 超遠心分離により精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量が
98重量%以上である請求の範囲第9項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造
10 方法。

11. 未置換の多糖類の含有量が2重量%以下である請求の範囲第10項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

- 15 12. ジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が0.05重量%以下である請求の範囲第10項または第11項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

- 20 13. ケトン系溶媒で精製した精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した後、その溶液に水を加えて混合し、未置換の多糖類を水層に移行させ、次に層分離した水層を分離除去することによりさらに精製を行う請求の範囲第1項ないし第8項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

- 25 14. ケトン系溶媒で精製した精製物に対して3～50重量倍の非プロトン性極性溶媒を添加して溶解した後、その溶液に対して5重量倍以上の水を添加し

て精製を行う請求の範囲第 1 3 項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

1 5. 非プロトン性極性溶媒が N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミドおよびジメチルスルホキシドからなる群より選択される 1 種以上である請求の範囲第 1 3 項または第 1 4 項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

1 6. 非プロトン性極性溶媒を用いて精製した精製物中の疎水性基含有多糖類の含有量が 9 8 重量%以上である請求の範囲第 1 3 項ないし第 1 5 項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

1 7. 未置換の多糖類の含有量が 2 重量%以下である請求の範囲第 1 6 項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

1 8. ジイソシアナート化合物中の 2 個の NCO 基が 2 個とも炭素数 1 2 ~ 5 0 の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が 0 . 0 2 重量%以下である請求の範囲第 1 6 項または第 1 7 項記載の高純度疎水性基含有多糖類の製造方法。

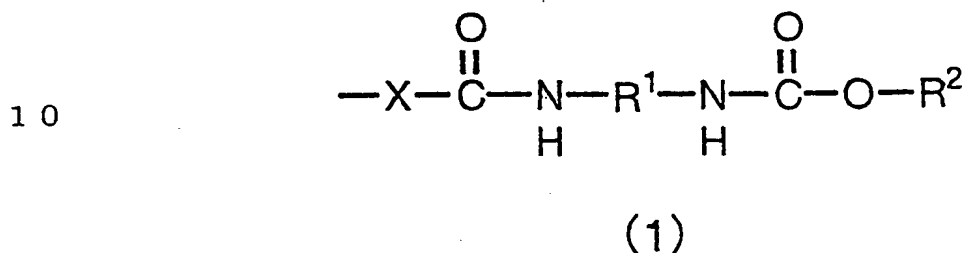
1 9. 第 1 段階反応として、炭素数 1 2 ~ 5 0 の水酸基含有炭化水素またはステロールと、 $\text{OCN}-\text{R}^1-\text{NCO}$ (式中、 R^1 は炭素数 1 ~ 5 0 の炭化水素基である。) で表されるジイソシアナート化合物とを反応させて、炭素数 1 2 ~ 5 0 の水酸基含有炭化水素またはステロールが 1 分子反応したイソシアナート基含疎水性化合物を製造し、

第 2 段階反応として、前記第 1 段階反応で得られたイソシアナートと多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数 1 2 ~ 5 0 の炭化水素基またはステ

リル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造し、

次に第2段階反応の反応生成物をケトン系溶媒で精製して得られる高純度疎水性基含有多糖類であって、

5 -XH基〔式中、Xは酸素原子またはNYで表される含窒素基（ここで、Yは水素原子または炭素数1～10の炭化水素基である。）〕を有する多糖類において、その多糖類を構成する糖単位100個あたり、0.1～10個の-XH基が、下記式（1）



15 〔式中、Xは前記Xと同じである。R¹は炭素数1～50の炭化水素基、R²は炭素数12～50の炭化水素基またはステリル基を示す。〕

で表される疎水性基で置換された疎水性基含有多糖類を80重量%以上含有する高純度疎水性基含有多糖類。

20 20. 多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レバン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカンおよび水溶性セルロースからなる群より選択される1種以上である請求の範囲第19項記載の高純度疎水性基含有多糖類。

25 21. 式（1）におけるR²がステリル基である請求の範囲第19項または第20項記載の高純度疎水性基含有多糖類。

22. 未置換の多糖類の含有量が20重量%以下である請求の範囲第19項ないし第21項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

5 23. ジイソシアナート化合物中の2個のNCO基が2個とも炭素数12～50の水酸基含有炭化水素またはステロールと反応した不純物の含有量が0.05重量%以下である請求の範囲第19項ないし第22項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

10 24. ケトン系溶媒で精製した精製物を超音波処理して水に微分散させ、次に超遠心分離によりさらに精製して得られるものである請求の範囲第19項ないし第23項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

15 25. ケトン系溶媒で精製した精製物を非プロトン性極性溶媒に溶解した後、その溶液に水を加えて混合し、未置換の多糖類を水層に移行させ、次に層分離した水層を分離除去することによりさらに精製して得られるものである請求の範囲第19項ないし第23項のいずれかに記載の高純度疎水性基含有多糖類。

20

25

図 1

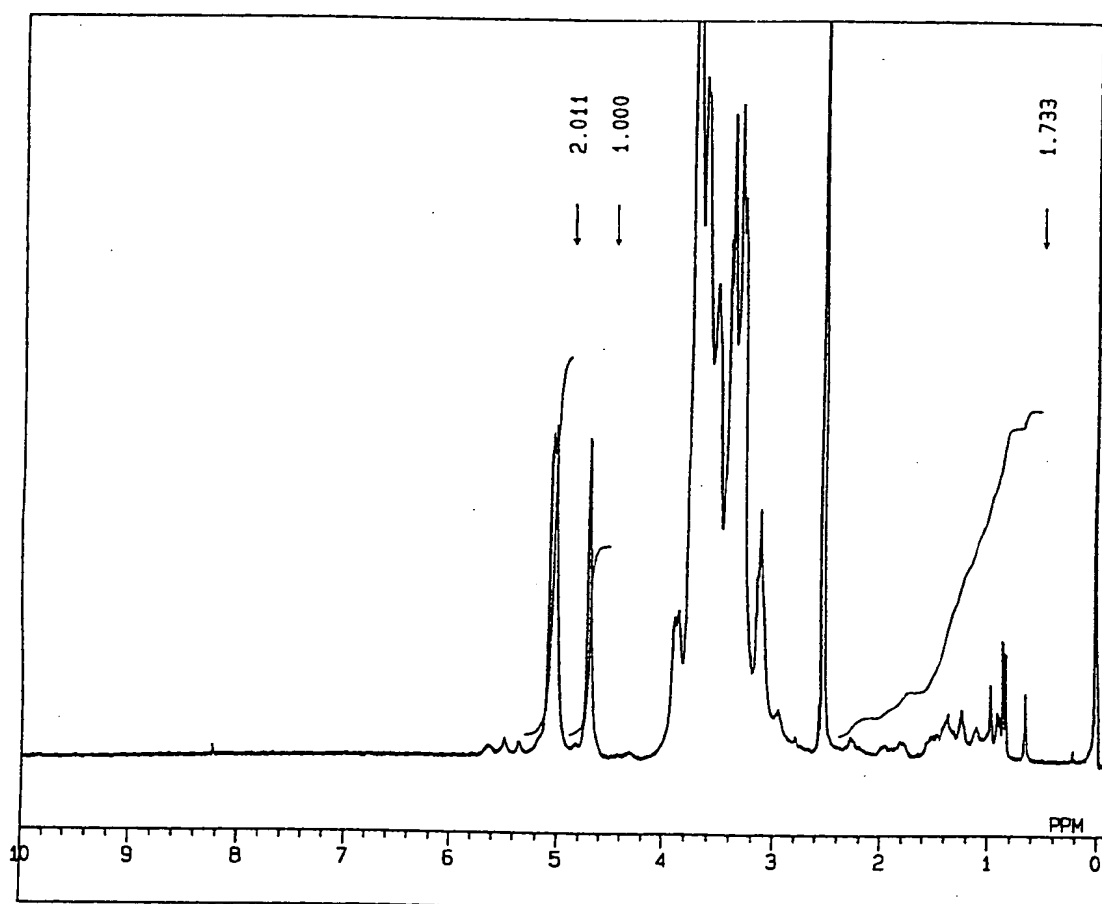
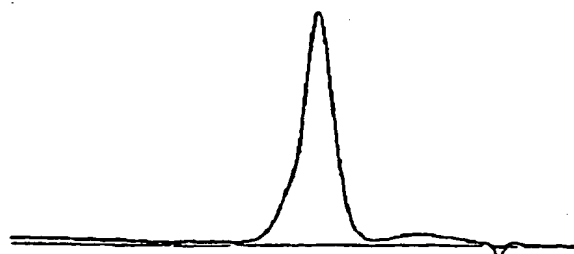


図 2

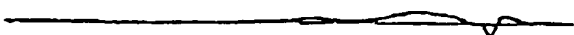
R.I. / a.u.



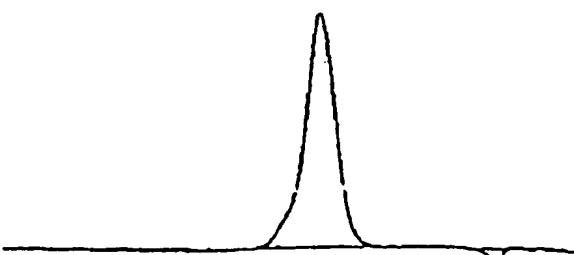
(a) 超音波照射前



(b) 超音波照射 30 分後



(c) 上澄み液



(d) 沈殿物

0 5 10 15 20 25 30

溶出時間 (分)

図 3

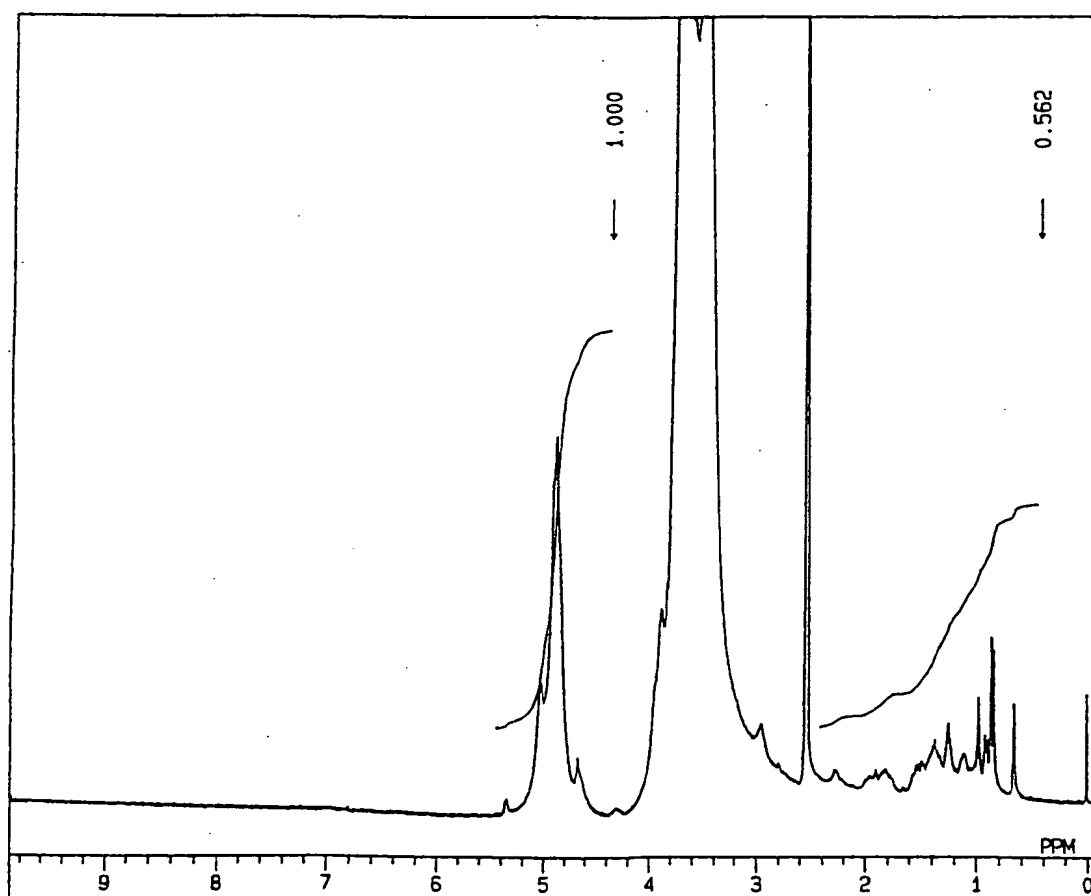


図 4

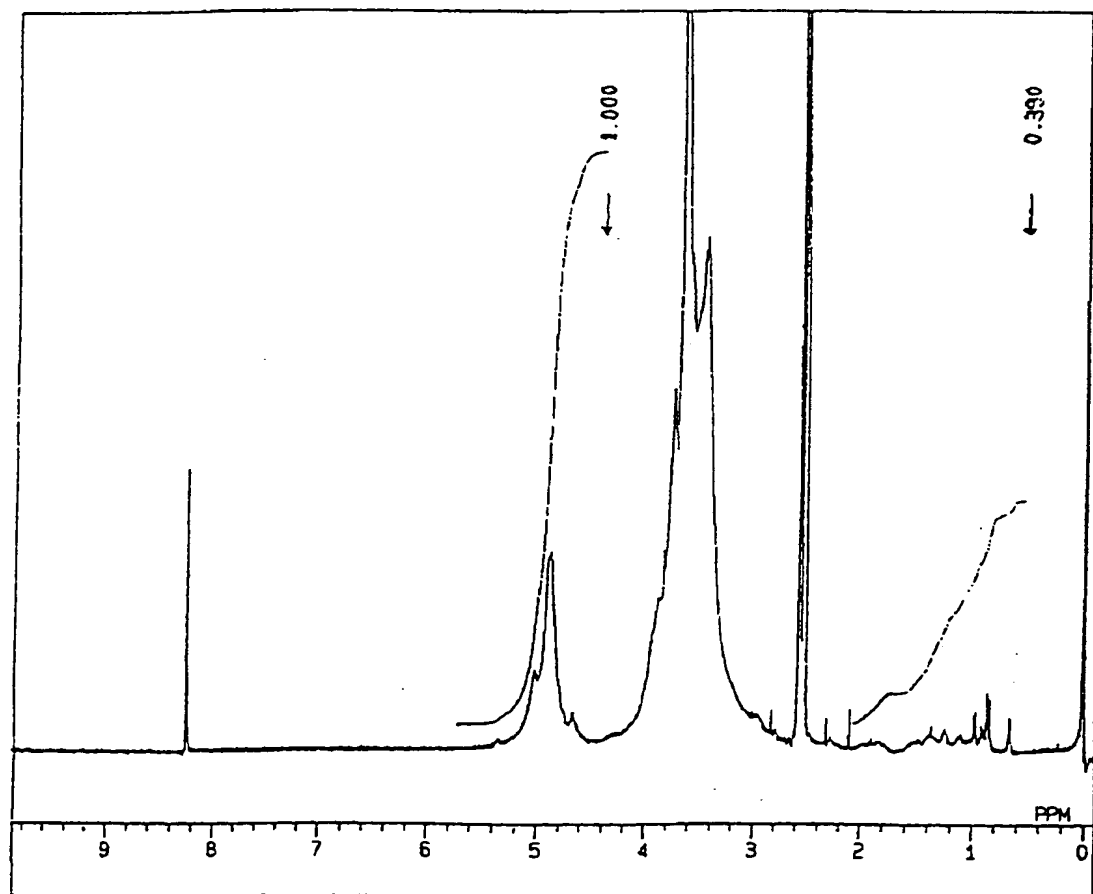
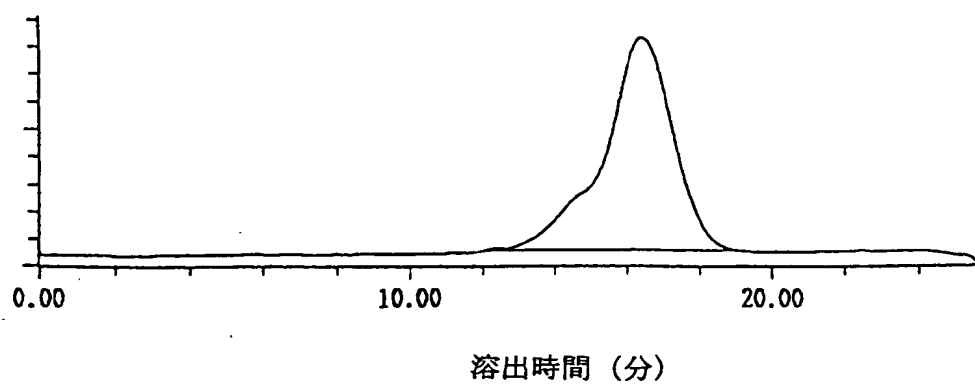


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C08B37/00, 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C08B37/00, 15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 61-69801, A (Junzou Sunamoto), 10 April, 1986 (10. 04. 86) (Family: none)	1-25
A	JP, 63-319046, A (Eisai Co., Ltd.), 27 December, 1988 (27. 12. 88) (Family: none)	1-25
A	JP, 2-144140, A (NOF Corp.), 1 June, 1990 (01. 06. 90) (Family: none)	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
16 April, 1999 (16. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
27 April, 1999 (27. 04. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C08B37/00, 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C08B37/00, 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 61-69801, A (砂本 順三), 10.4月.1986 (10.04.86), (ファミリーなし)	1-25
A	J P, 63-319046, A (エーザイ株式会社), 27.12月.1988(27.12.88), (ファミリーなし)	1-25
A	J P, 2-144140, A (日本油脂株式会社), 1.6月.1990 (01.06.90), (ファミリーなし)	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.04.99

国際調査報告の発送日

27.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘實 謙二

4 P

7433

印

電話番号 03-3581-1101 内線 6617